

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 39/285

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98103220.6

[45]授权公告日 2000 年 8 月 9 日

[11]授权公告号 CN 1055249C

[22]申请日 1998.7.15 [24]颁证日 2000.8.12

[21]申请号 98103220.6

[73]专利权人 沈继平

地址 510080 广东省广州市东山区农林东路东
园新村 48 栋 8 号 701 室

[72]发明人 沈继平

[56]参考文献

JP62044178A 1987. 2.26 A61K39/28

WO9522967A1 1995. 8.31 A61K31/195

WO9811900A2 1998. 3.26 A61K31/68

审查员 魏春宝

权利要求书 4 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 一种镇痛药和其制造方法

[57]摘要

本发明提供了一种镇痛药和其制造方法。用牛痘病毒接种大白兔,经溶剂抽提、酸处理、碱处理、吸附和洗脱以及浓缩等步骤从该大白兔的发痘皮肤组织制备活性制剂,然后将该活性制剂与药用辅料组合,即得到本发明的镇痛药。本发明的镇痛药镇痛作用强,副作用极小。

ISSN 1000-8427 4



权 利 要 求 书

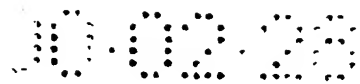
1. 一种镇痛药, 该镇痛药含有活性制剂和药用辅料, 其中所说的活性制剂含有天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯基丙氨酸、赖氨酸、组氨酸, 并且含有尿刊酸、尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶; 该制剂为无色或浅黄色液体, pH 值为 7.0-8.0, 在 265-275 nm 具有紫外吸收, 茚三酮反应为阳性, 各种蛋白质检测为阴性, 3,5-二羟基甲苯-盐酸反应为阳性, 砷钼酸法成色反应为阳性。

2. 按照权利要求 1 的镇痛药, 其中所说的活性制剂中各种物质的含量范围分别为($\mu\text{g/ml}$): 天冬氨酸 0.2-0.5、苏氨酸 0.1-0.4、丝氨酸 0.3-0.8、谷氨酸 0.7-1.4、甘氨酸 0.3-0.7、丙氨酸 0.4-0.9、缬氨酸 0.1-0.4、异亮氨酸 0.1-0.3、亮氨酸 0.1-0.4、酪氨酸 0.2-0.6、苯基丙氨酸 0.1-0.4、赖氨酸 0.05-0.2、组氨酸 0.1-0.4、尿刊酸 12.0-22.5、尿嘧啶 6.5-12.1、次黄嘌呤 0.7-1.4、黄嘌呤 5.4-10.2、胸腺嘧啶 1.3-2.5。

3. 按照权利要求 1 或 2 的镇痛药, 其中所说的活性制剂是由以下步骤制备的:

- a) 用牛痘苗病毒(*Vaccinum variolae*)lister 接种大白兔, 收集出痘的皮肤组织;
- b) 将收集到的组织切成小块, 向其中加入 2.5-3.5 倍量的 2% 的苯酚水溶液, 浸泡, 离心并过滤, 得到溶液 A;
- c) 将溶液 A 调至弱酸性, 煮沸后离心并过滤, 得到溶液 B;
- d) 将溶液 B 调至弱碱性, 煮沸后过滤, 得到溶液 C;
- e) 将溶液 C 调至弱酸性, 向其中加入吸附剂, 浸泡后, 过滤, 在碱性环境下用水洗脱吸附剂, 得到溶液 D;
- f) 将溶液 D 调至弱酸性, 加热后冷却, 得到溶液 E;
- g) 减压浓缩溶液 E 并过滤。

4. 按照权利要求 3 的镇痛药, 其中所说的活性制剂是由以下步骤制备的:



- a) 用牛痘苗病毒 lister 接种大白兔，收集出痘的皮肤组织；
- b) 将所收集到的组织切成小块，向其中加入 3 倍量的 2% 的苯酚水溶液，浸泡 72 小时，离心并过滤后，得到溶液 A；
- c) 将溶液 A 的 pH 值调至 5.0，煮沸 30 分钟后离心并过滤，得到溶液 B；
- d) 将溶液 B 的 pH 值调至 9.2，煮沸 30 分钟后过滤，得到溶液 C；
- e) 将溶液 C 的 pH 值调至 4.5，向其中加入活性炭，浸泡 4 小时后，过滤，在 pH 11.0 下用水洗脱活性炭，得到溶液 D；
- f) 将溶液 D 的 pH 值调至 6.0，加热到 121 °C，冷却至 40 °C 以下，得到溶液 E；
- g) 在 60 °C 下减压浓缩溶液 E，然后过滤。

5. 一种生产按照权利要求 1 或 2 或 3 的镇痛药的方法，该方法包括以下步骤：

- a) 用牛痘苗病毒 lister 接种大白兔，收集出痘的皮肤组织；
- b) 将收集到的组织切成小块，向其中加入 2.5-3.5 倍量的 2% 的苯酚水溶液，浸泡，离心并过滤，得到溶液 A；
- c) 将溶液 A 调至弱酸性，煮沸后离心并过滤，得到溶液 B；
- d) 将溶液 B 调至弱碱性，煮沸后过滤，得到溶液 C；
- e) 将溶液 C 调至弱酸性，向其中加入吸附剂，浸泡后，过滤，在碱性环境下用水洗脱吸附剂，得到溶液 D；
- f) 将溶液 D 调至弱酸性，加热后冷却，得到溶液 E；
- g) 减压浓缩溶液 E 并过滤，得到活性制剂；
- h) 将活性制剂与药用辅料组合。

6. 按照权利要求 5 的方法，该方法包括以下步骤：

- a) 用牛痘苗病毒 lister 接种大白兔，收集出痘的皮肤组织；
- b) 将所收集到的组织切成小块，向其中加入 3 倍量的 2% 的苯酚水溶液，浸泡 72 小时，离心并过滤后，得到溶液 A；
- c) 将溶液 A 的 pH 值调至 5.0，煮沸 30 分钟后离心并过滤，得到溶液 B；
- d) 将溶液 B 的 pH 值调至 9.2，煮沸 30 分钟后过滤，得到溶液 C；
- e) 将溶液 C 的 pH 值调至 4.5，向其中加入活性炭，浸泡 4 小时后，过滤，

在 pH 11.0 下用水洗脱活性炭，得到溶液 D；

f) 将溶液 D 的 pH 值调至 6.0，加热到 121 °C，冷却至 40 °C 以下，得到溶液 E；

g) 在 60 °C 下减压浓缩溶液 E，然后过滤，得到活性制剂；

h) 将活性制剂与药用辅料组合。

7. 一种活性制剂，其含有天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯基丙氨酸、赖氨酸、组氨酸，并且含有尿刊酸、尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶；该制剂为无色或浅黄色液体，pH 值为 7.0-8.0，在 265-275 nm 具有紫外吸收，茚三酮反应为阳性，各种蛋白质检测为阴性，3,5-二羟基甲苯-盐酸反应为阳性，砷钼酸法成色反应为阳性。

8. 按照权利要求 7 的活性制剂，其中所说的各种物质的含量范围分别为(μg/ml): 天冬氨酸 0.2-0.5、苏氨酸 0.1-0.4、丝氨酸 0.3-0.8、谷氨酸 0.7-1.4、甘氨酸 0.3-0.7、丙氨酸 0.4-0.9、缬氨酸 0.1-0.4、异亮氨酸 0.1-0.3、亮氨酸 0.1-0.4、酪氨酸 0.2-0.6、苯基丙氨酸 0.1-0.4、赖氨酸 0.05-0.2、组氨酸 0.1-0.4、尿刊酸 12.0-22.5、尿嘧啶 6.5-12.1、次黄嘌呤 0.7-1.4、黄嘌呤 5.4-10.2、胸腺嘧啶 1.3-2.5。

9. 按照权利要求 8 的活性制剂，其是由以下步骤制备的：

a) 用牛痘病毒(*Vaccinum variolae*)lister 接种大白兔，收集出痘的皮肤组织；

b) 将收集到的组织切成小块，向其中加入 2.5-3.5 倍量的 2% 的苯酚水溶液，浸泡，离心并过滤，得到溶液 A；

c) 将溶液 A 调至弱酸性，煮沸后离心并过滤，得到溶液 B；

d) 将溶液 B 调至弱碱性，煮沸后过滤，得到溶液 C；

e) 将溶液 C 调至弱酸性，向其中加入吸附剂，浸泡后，过滤，在碱性环境下用水洗脱吸附剂，得到溶液 D；

f) 将溶液 D 调至弱酸性，加热后冷却，得到溶液 E；

g) 减压浓缩溶液 E 并过滤。

10. 按照权利要求 9 的活性制剂，其是由以下方法制备的：



- a) 用牛痘苗病毒 lister 接种大白兔，收集出痘的皮肤组织；
- b) 将所收集到的组织切成小块，向其中加入 3 倍量的 2% 的苯酚水溶液，浸泡 72 小时，离心并过滤后，得到溶液 A；
- c) 将溶液 A 的 pH 值调至 5.0，煮沸 30 分钟后离心并过滤，得到溶液 B；
- d) 将溶液 B 的 pH 值调至 9.2，煮沸 30 分钟后过滤，得到溶液 C；
- e) 将溶液 C 的 pH 值调至 4.5，向其中加入活性炭，浸泡 4 小时后，过滤，在 pH 11.0 下用水洗脱活性炭，得到溶液 D；
- f) 将溶液 D 的 pH 值调至 6.0，加热到 121 °C，冷却至 40 °C 以下，得到溶液 E；
- g) 在 60 °C 下减压浓缩溶液 E，然后过滤。

一种镇痛药和其制造方法

本发明涉及一种镇痛药和其制造方法。用牛痘苗病毒(vaccinia virus)接种大白兔，经溶剂抽提、酸处理、碱处理、吸附和洗脱以及浓缩等步骤从该大白兔的发痘皮肤组织制备活性制剂，然后将该活性制剂与药用辅料组合，即得到本发明的镇痛药。

镇痛药主要是一类作用于中枢神经系统，选择性抑制痛觉同时不影响其感觉的药物。阿片样生物碱及其合成代用品是典型的中枢作用镇痛药，它们的镇痛作用较强，但副作用也较为严重，反复应用后容易产生成瘾性、耐受性以及呼吸抑制等。目前，临床上还没有一种镇痛作用强，而副作用极小的镇痛药。

因此，本发明的目的是提供一种镇痛作用强，而副作用极小的镇痛药以及该镇痛药的制造方法。

本发明的镇痛药含有活性制剂和药用辅料，其中所说的活性制剂含有天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯基丙氨酸、赖氨酸、组氨酸，并且含有尿刊酸、尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶，以上各种物质的含量范围分别为($\mu\text{g/ml}$): 天冬氨酸 0.2-0.5、苏氨酸 0.1-0.4、丝氨酸 0.3-0.8、谷氨酸 0.7-1.4、甘氨酸 0.3-0.7、丙氨酸 0.4-0.9、缬氨酸 0.1-0.4、异亮氨酸 0.1-0.3、亮氨酸 0.1-0.4、酪氨酸 0.2-0.6、苯基丙氨酸 0.1-0.4、赖氨酸 0.05-0.2、组氨酸 0.1-0.4、尿刊酸 12.0-22.5、尿嘧啶 6.5-12.1、次黄嘌呤 0.7-1.4、黄嘌呤 5.4-10.2、胸腺嘧啶 1.3-2.5；该制剂为无色或浅黄色液体，pH 值为 7.0-8.0，在 265-275 nm 具有紫外吸收，茚三酮反应为阳性，各种蛋白质检测为阴性，3,5-二羟基甲苯-盐酸反应为阳性，砷钼酸法成色反应为阳性，该活性制剂是由以下步骤制备的：

a) 用牛痘苗病毒(*Vaccinum variolae*)lister 接种大白兔，收集出痘的皮肤组织；



- b) 将收集到的组织切成小块，向其中加入 2.5-3.5 倍量(重量)的 2%的苯酚水溶液，浸泡，离心并过滤，得到溶液 A；
- c) 将溶液 A 调至弱酸性，煮沸后离心并过滤，得到溶液 B；
- d) 将溶液 B 调至弱碱性，煮沸后过滤，得到溶液 C；
- e) 将溶液 C 调至弱酸性，向其中加入吸附剂，浸泡后，过滤，在碱性环境下用水洗脱吸附剂，得到溶液 D；
- f) 将溶液 D 调至弱酸性，加热后冷却，得到溶液 E；
- g) 减压浓缩溶液 E 并过滤。

优选地，该活性制剂是由以下步骤制备的：

- a) 用牛痘病毒 lister 接种大白兔，收集出痘的皮肤组织；
- b) 将所收集到的组织切成小块，向其中加入 3 倍量(重量)的 2%的苯酚水溶液，浸泡 72 小时，离心并过滤后，得到溶液 A；
- c) 将溶液 A 的 pH 值调至 5.0，煮沸 30 分钟后离心并过滤，得到溶液 B；
- d) 将溶液 B 的 pH 值调至 9.2，煮沸 30 分钟后过滤，得到溶液 C；
- e) 将溶液 C 的 pH 值调至 4.5，向其中加入活性炭，浸泡 4 小时后，过滤，在 pH 11.0 下用水洗脱活性炭，得到溶液 D；
- f) 将溶液 D 的 pH 值调至 6.0，加热到 121 °C，冷却至 40 °C 以下，得到溶液 E；
- g) 在 60 °C 下减压浓缩溶液 E，然后过滤。

获得所说的活性制剂后，将该活性制剂与药用辅料组合即可得到本发明的镇痛药。该镇痛药可以是各种适于临床使用的剂型，包括针剂、片剂、软膏剂、胶囊剂、颗粒剂等，优选的是针剂。所说的药用辅料包括各种药用辅料。在针剂中，辅料可以是注射用蒸馏水、生理盐水、注射用植物油、葡萄糖注射液、丙二醇、聚乙二醇等，还可以是各种稳定剂、乳化剂等；在片剂、胶囊剂和颗粒剂中，辅料可以是淀粉、乳糖、甘露醇等赋形剂，结晶纤维素、阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶、聚乙烯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮等结合剂，羧甲基纤维素、聚乙二醇、马铃薯淀粉定崩解剂，滑石粉、硬脂酸镁等润滑剂，甘油等润湿剂等。在软膏剂中，辅料可以是脂肪油、石蜡、羊毛脂、凡士林、乙二醇、甘油等基质等。



药理和临床试验表明,本发明的镇痛药对多种疾病具有镇痛作用。这些疾病包括各种神经痛、腰痛、胆绞痛、心绞痛、动脉栓塞性疼痛、创伤烧伤烫伤等的剧烈疼痛、手术期间和手术后的疼痛、消化性溃疡病疼痛、痛经、分娩后的宫缩痛、头痛、各种肿瘤引起的疼痛等。本发明的镇痛药还可以改善免疫功能。此外,本发明的镇痛药具有极小的副作用。

采用镇痛阈值低下的自律神经失调症模型,用特定室温刺激的应急态鼠进行的研究表明,无论是用热刺激的 Thamr-Smith 法,还是机械性压力刺激的 Randall-Selitto 法,都确认本发明的镇痛药对自律神经失调症模型鼠有明显的镇痛作用。

临床上用本发明的镇痛药对 20 个瘙痒性皮肤病患者进行了试验,皮下注射本发明的镇痛药,1 日 1 安瓿(3 毫升),1 周 3 次以上,给药 2 周,给药结束时,完全改善和中度改善者占 70%,轻度改善以上为 95%。对 29 例腰痛患者的肌肉和皮下临床实验显示也显示了本发明的镇痛药的有用性和安全性。

以与免疫机能有关的炎症为指标,综合考虑 48 小时同源 PCA 抑制作用,以及抗补体活性对巨噬细胞的活性作用的研究显示,本发明的镇痛药可以有效地促进巨噬细胞活化作用,明显抑制作为 I 型变态反应模型的小鼠的 IgE 抗体而引起的 48 小时同源 PCA 反应,并且可以抑制作为 II 型变态反应的模型抗补体活性,其作用与用量成线性关系。由此可知,本发明的镇痛药具有抑制与免疫机能有关的炎症的作用,可以改善免疫功能。

以本发明的镇痛药对小鼠和大鼠进行一次性口服、腹腔及皮下给药确定了其急性毒性。腹腔和皮下给药 6,000 单位/kg,口服给药 10,000 单位/kg,在 14 天的观察期中,雄鼠的皮下组中只有一例确认为死亡,其它给药组全部生存。皮下给药组中一例雄鼠在给药后 5 天死亡,对该死亡鼠的解剖未发现特殊异常,因此不能认为是因药物影响而死亡。将本发明的镇痛药以 30、60 以及 120 单位/kg 连续 28 天向大鼠腹腔给药,在任意一组中都没有出现死亡,尿检、眼科检查、血液化学检查、病理组织学检查和解剖均说明不存在由于本发明的镇痛药的给药引起的变化。这些说明本发明的镇痛药毒性很小。



采用豚鼠和小白鼠进行的抗原性实验表明,本发明的镇痛药没有抗原性。以兔子为实验对象,采用浸润注射的方式,以肉眼及病理组织学所观察到的合计伤痕的总数为依据进行的安全性测试表明,本发明的镇痛药对家兔肌肉的局部毒理作用非常低。

在 Slc:ddy 系 SPF 小鼠的胎儿器官形成期(相当于妊娠 6-15 天)1 日 1 次皮下注射本发明的镇痛药,剂量分别为 1.2, 12 即 120 单位/kg,由此研究了本发明的镇痛药对动物、胎儿及幼仔的影响。结果表明给药不影响妊娠和哺乳期的一般状态,体重以及食量,分娩后的哺乳状态及解剖检查都没有发现与注射被检物有关的异常。没有发现胎儿因注射被检物而引起的外表、骨骼及器官形态的特异性异常。注射被检物后对幼仔的存活性、体重变化、外表分化、断奶时的各种机能、行为以及生殖机能均无影响。

用细菌(鼠伤寒沙门氏杆菌 TA100、TA98、TA1535、TA1537 和大肠杆菌 WP2uvrA)进行的回复试验说明本发明的镇痛药对遗传因子没有诱导变异作用。用哺乳动物培养细胞(CHL)进行的染色体异常试验表明本发明的镇痛药对染色体没有诱导变异作用。用 ICR(Crj:CD-1)系雄性小鼠进行的小核试验表明,本发明的镇痛药对染色体没有诱导变异作用。

以下用实施例进一步说明本发明。

实施例 1 制备用于接种的抗原

将一只体重 2.5 千克,睾丸 3 厘米且结实的成年健康日本大耳白兔用作抗原继代的公兔。用 70%酒精棉球消毒阴囊,将抗原牛痘苗(*vaccinum variolae*) lister (干燥痘疮疫苗,日本国立预防卫生研究所(东京都品川区上大崎 2-10-35)生产)溶解,摇匀,用 1 毫升针管抽取 0.2 毫升,向一只兔睾丸的中央内层注射,将接种后的兔子放入专用的兔舍内,保证充分的饮水以及饲料供应,每天观察两次,第 4 天达到最佳状态(睾丸变硬、肿胀和变紫)。用力拉断颈椎,用 70%酒精棉球消毒阴囊外围,剪开阴囊,去除睾丸结缔组织。将已剪采的睾丸经生理盐水(0.9%)清洗,再经 2 次 PBS(-)(氯化钠 80 克,氯化钾 2 克,磷酸二氢钠 11.5 克,二水磷酸二氢钾 2 克,加注射水至 10 升)溶液冲洗两次,晾干,称重,放入装有冰块专用容器内,



最终放入-80℃的超低温冰箱中保存。将组织(睾丸)拿出冰箱软化1小时,在低温(4℃)下磨碎,以1:1与EAGLE'S培养基(Eagle's粉末9.4克,10%碳酸氢钠12.5-22.0毫升,谷氨酰胺10毫升,注射水1升)混合,分装后,放入-80℃的超低温冰箱中冻结1小时,再取出在37℃的水浴箱中解冻,反复3次。然后,进行低温离心(4℃,3500rpm,20分钟)。分装为10毫升一只放入-80℃的超低温冰箱中保存。

实施例2 制备活性制剂

从-80℃的超低温冰箱中取出抗原,放入30℃的温箱中使其慢慢溶化。用一支10毫升的针管抽取按实施例1制备的抗原5毫升(每毫升含 10^7 - 10^8 个病毒),注入500毫升的PBS(-)溶液中,摇匀,得到注射用抗原。将一只健康的成熟大耳白兔(2.75千克)背上的毛剪去,用75%酒精棉球擦拭已剪去毛的部位。用以上制得的注射用抗原皮内注射该兔,从左至右每隔1.5厘米注射一针,每排注射11个点,每一边注射5排,每针含抗原量0.2毫升,注意不漏水、不空打,不注穿皮肤。将注射过抗原的兔饲养4天。发痘良好,颜色由红润转为紫红,皮肤增厚,皮下有水肿,臀部水肿明显。用颈椎脱臼法处死兔,15分钟内完成采皮。用塑料袋包装兔皮,立即存放在-80℃的冰柜中备用。将兔皮(20×20厘米,200克)切成1平方厘米的小块,向其中加入3.5倍量(重量)的2%苯酚水溶液。向该溶液中通入氮气3分钟,使其冒泡,然后密封。将其置于4℃环境下72小时,液体成为乳液后离心,取出上清液,用5号滤纸过滤,得到褐色溶液A;向溶液A中通入氮气3分钟,使其冒泡,用1M盐酸将该溶液的pH值调至5.0,于水浴中煮沸30分钟,立即降温至28℃,接着离心,然后用5号滤纸低压过滤上清液,得到溶液B;向溶液B中通入氮气3分钟,使其冒泡,用1M氢氧化钠将滤液的pH值调至9.2,于水浴中煮沸30分钟,立即降温至28℃,然后用5号滤纸及0.45μm滤膜低压过滤,得到溶液C;向溶液C中通入氮气3分钟,使其冒泡,用1M盐酸将滤液的pH值调至4.5,向溶液C中通入氮气3分钟,使其冒泡,向其中加入40克活性炭,于30℃和不断搅拌下浸泡4小时,停止搅拌,使其静置30分钟,抽掉上层清液,



在氮气环境下用 5 号滤纸低压过滤, 然后以注射水(pH 8.0)浸泡及洗净活性炭, 在氮气环境下用 5 号滤纸低压过滤, 弃去滤液收集和贮存活性炭, 把载有活性炭的器皿加进 400 毫升注射水中, 通入氮气使其冒泡, 用 1M 氢氧化钠将 pH 调至 11.0, 连续搅拌 4 小时。在氮气环境下用 0.45 μ m 滤膜过滤, 再以 40 毫升注射水洗净活性炭, 得到溶液 D; 用 1M 盐酸将 pH 调至 6.0, 向其中通入氮气并封存于容器内。向容器内通入氮气 5 分钟, 使其冒泡, 密封容器, 加热至 121 $^{\circ}$ C, 保持 20 分钟, 然后冷却至 40 $^{\circ}$ C 以下, 得到溶液 E; 将溶液 E 抽入减压蒸馏器, 使减压蒸馏器内的空气更换成氮气, 在 60 $^{\circ}$ C 下减压蒸馏至体积为 5 毫升, 以 5 号滤纸过滤, 接着以 0.2 μ m 滤膜过滤, 得到 5 毫升活性制剂。该活性制剂含有天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯基丙氨酸、赖氨酸、组氨酸, 并且含有尿刊酸、尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶, 以上各种物质的含量分别为(μ g/ml): 天冬氨酸 0.3、苏氨酸 0.2、丝氨酸 0.5、谷氨酸 1.1、甘氨酸 0.5、丙氨酸 0.6、缬氨酸 0.3、异亮氨酸 0.1、亮氨酸 0.3、酪氨酸 0.4、苯基丙氨酸 0.2、赖氨酸 0.1、组氨酸 0.2、尿刊酸 18.2、尿嘧啶 9.5、次黄嘌呤 1.1、黄嘌呤 8.6、胸腺嘧啶 2.0。该制剂为无色液体, pH 值约 7.5, 在 265-275 nm 具有紫外吸收, 茚三酮反应为阳性, 各种蛋白质检测为阴性, 3,5-二羟基甲苯-盐酸反应为阳性, 砷钼酸法成色反应为阳性。

实施例 3 制备活性制剂

从 -80 $^{\circ}$ C 的超低温冰箱中取出抗原, 放入 30 $^{\circ}$ C 的温箱中使其慢慢溶化。用一支 10 毫升的针管抽取按实施例 1 制备的抗原 5 毫升(每毫升含 10^7 - 10^8 个病毒), 注入 500 毫升的 PBS(-) 溶液中, 摇匀, 得到注射用抗原。将一只健康的成熟大耳白兔(2.5 千克)背上的毛剪去, 用 75% 酒精棉球擦拭已剪去毛的部位。用以上制得的注射用抗原皮内注射该兔, 从左至右每隔 1.5 厘米注射一针, 每排注射 10 个点, 每一边注射 5 排, 每针含抗原量 0.2 毫升; 注意不漏水、不空打, 不注穿皮肤。将注射过抗原的兔饲养 3 天。发痘良好, 颜色由红润转为紫红, 皮肤增厚, 皮下有水肿, 臀部水肿明显。用颈



椎脱臼法处死兔，15分钟内完成采皮。用塑料袋包装兔皮，立即存放在-80℃的冰柜中备用。将兔皮(18×18厘米，180克)切成1平方厘米的小块，向其中加入2.5倍量(重量)的2%的苯酚水溶液。向该溶液中通入氮气3分钟，使其冒泡，然后密封。将其置于4℃环境下70小时，液体成为乳液后离心，取出上清液，用5号滤纸过滤，得到褐色溶液A；向溶液A中通入氮气3分钟，使其冒泡，用1M盐酸将该溶液的pH值调至4.5，于水浴中煮沸30分钟，立即降温至26℃，接着离心，然后用5号滤纸低压过滤上清液，得到溶液B；向溶液B中通入氮气3分钟，使其冒泡，用1M氢氧化钠将滤液的pH值调至8.7，于水浴中煮沸30分钟，立即降温至26℃，然后用5号滤纸及0.45μm滤膜低压过滤，得到溶液C；向溶液C中通入氮气3分钟，使其冒泡，用1M盐酸将滤液的pH值调至4.0，向溶液C中通入氮气3分钟，使其冒泡，向其中加入30克活性炭，于25℃和不断搅拌下浸泡4小时，停止搅拌，使其静置30分钟，抽掉上层清液，在氮气环境下用5号滤纸低压过滤，然后以注射水(pH 8.0)浸泡及洗净活性炭，在氮气环境下用5号滤纸低压过滤，弃去滤液收集和贮存活性炭，把载有活性炭的器皿加进360毫升注射水中，通入氮气使其冒泡，用1M氢氧化钠将pH调至10.5，连续搅拌4小时。在氮气环境下用0.45μm滤膜过滤，再以45毫升注射水洗净活性炭，得到溶液D；用1M盐酸将pH调至5.5，向其中通入氮气并封存于容器内。向容器内通入氮气5分钟，使其冒泡，密封容器，加热至120℃，保持20分钟，然后冷却至40℃以下，得到溶液E；将溶液E抽入减压蒸馏器，使减压蒸馏器内的空气更换成氮气，在70℃下减压蒸馏至体积为5毫升，以5号滤纸过滤，接着以0.2μm滤膜过滤，得到2毫升活性制剂。该活性制剂含有天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯基丙氨酸、赖氨酸、组氨酸，并且含有尿刊酸、尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶，以上各种物质的含量分别为(μg/ml)：天冬氨酸0.2、苏氨酸0.4、丝氨酸0.3、谷氨酸1.4、甘氨酸0.7、丙氨酸0.4、缬氨酸0.1、异亮氨酸0.3、亮氨酸0.4、酪氨酸0.6、苯基丙氨酸0.1、赖氨酸0.05、组氨酸0.4、尿刊酸12.0、尿嘧啶12.1、次黄嘌呤1.4、黄嘌呤5.4、胸



腺嘧啶 1.3。该制剂为无色液体，pH 值为 7.0，在 265-275 nm 具有紫外吸收，茚三酮反应为阳性，各种蛋白质检测为阴性，3,5-二羟基甲苯-盐酸反应为阳性，砷钼酸法成色反应为阳性。

实施例 4 制备活性制剂

从-80℃的超低温冰箱中取出抗原，放入 30℃的温箱中使其慢慢溶化。用一支 10 毫升的针管抽取按实施例 1 制备的抗原 5 毫升(每毫升含 10^7 - 10^8 个病毒)，注入 500 毫升的 PBS(-)溶液中，摇匀，得到注射用抗原。将一只健康的成熟大耳白兔(3 千克)背上的毛剪去，用 75%酒精棉球擦拭已剪去毛的部位。用以上制得的注射用抗原皮内注射该兔，从左至右每隔 1.5 厘米注射一针，每排注射 12 个点，每一边注射 5 排，每针含抗原量 0.2 毫升，注意不漏水、不空打，不注穿皮肤。将注射过抗原的兔饲养 4 天。发痘良好，颜色由红润转为紫红，皮肤增厚，皮下有水肿，臀部水肿明显。用颈椎脱臼法处死兔，15 分钟内完成采皮。用塑料袋包装兔皮，立即存放在-80℃的冰柜中备用。将兔皮(22 × 22 厘米，220 克)切成 1 平方厘米的小块，向其中加入 2 倍量(重量)的 2%苯酚水溶液。向该溶液中通入氮气 3 分钟，使其冒泡，然后密封。将其置于 4℃环境下 72 小时，液体成为乳液后离心，取出上清液，用 5 号滤纸过滤，得到褐色溶液 A；向溶液 A 中通入氮气 3 分钟，使其冒泡，用 1M 盐酸将该溶液的 pH 值调至 5.5，于水浴中煮沸 30 分钟，立即降温至 30℃，接着离心，然后用 5 号滤纸低压过滤上清液，得到溶液 B；向溶液 B 中通入氮气 3 分钟，使其冒泡，用 1M 氢氧化钠将滤液的 pH 值调至 9.7，于水浴中煮沸 30 分钟，立即降温至 30℃，然后用 5 号滤纸及 0.45μm 滤膜低压过滤，得到溶液 C；向溶液 C 中通入氮气 3 分钟，使其冒泡，用 1M 盐酸将滤液的 pH 值调至 4.8，向溶液 C 中通入氮气 3 分钟，使其冒泡，向其中加入 44 克活性炭，于 35℃和不断搅拌下浸泡 4 小时；停止搅拌，使其静置 30 分钟，抽掉上层清液，在氮气环境下用 5 号滤纸低压过滤，然后以注射水(pH 8.0)浸泡及洗净活性炭，在氮气环境下用 5 号滤纸低压过滤，弃去滤液收集和贮存活性炭，把载有活性炭的器皿加进 440 毫升注射水中，通入氮气使其冒泡，用 1M-氢



氧化钠将 pH 调至 11.5，连续搅拌 4 小时。在氮气环境下用 0.45 μ m 滤膜过滤，再以 50 毫升注射水洗净活性炭，得到溶液 D；用 1M 盐酸将 pH 调至 6.5，向其中通入氮气并封存于容器内。向容器内通入氮气 5 分钟，使其冒泡，密封容器，加热至 121 $^{\circ}$ C，保持 20 分钟，然后冷却至 45 $^{\circ}$ C 以下，得到溶液 E；将溶液 E 抽入减压蒸馏器，使减压蒸馏器内的空气更换成氮气，在 55 $^{\circ}$ C 下减压蒸馏至体积为 5 毫升，以 5 号滤纸过滤，接着以 0.2 μ m 滤膜过滤，得到 4 毫升活性制剂。该活性制剂含有天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯基丙氨酸、赖氨酸、组氨酸，并且含有尿刊酸、尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、胸腺嘧啶，以上各种物质的含量分别为(μ g/ml)：天冬氨酸 0.5、苏氨酸 0.1、丝氨酸 0.8、谷氨酸 0.7、甘氨酸 0.3、丙氨酸 0.9、缬氨酸 0.4、异亮氨酸 0.1、亮氨酸 0.1、酪氨酸 0.2、苯基丙氨酸 0.4、赖氨酸 0.2、组氨酸 0.1、尿刊酸 22.5、尿嘧啶 6.5、次黄嘌呤 0.7、黄嘌呤 10.2、胸腺嘧啶 2.5。该制剂为浅黄色液体，pH 值为 8.0，在 265-275 nm 具有紫外吸收，茚三酮反应为阳性，各种蛋白质检测为阴性，3,5-二羟基甲苯-盐酸反应为阳性，砷钼酸法成色反应为阳性。

实施例 5 制备针剂

采用以下配方，按照常规制备针剂的方法制备针剂：

实施例 2 中所获得的活性制剂 5 毫升

氯化钠 2.6 克

注射用蒸馏水 300 毫升。

实施例 6 制备针剂

采用以下配方，按照常规制备针剂的方法制备针剂：

实施例 3 中所获得的活性制剂 5 毫升

氯化钠 2.52 克

注射用蒸馏水 280 毫升。

实施例 7 制备针剂

采用以下配方，按照常规制备针剂的方法制备针剂：

实施例 4 中所获得的活性制剂 5 毫升

氯化钠 2.79 克

注射用蒸馏水 310 毫升。

实施例 8 制备片剂

采用以下配方，按照常规制备针剂的方法制备片剂：

实施例 2 所获得的活性制剂 50 毫升

乳糖 125 毫克

结晶纤维素 20 克

硬脂酸镁 5 毫克。